

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-352093

(43)Date of publication of application : 24.12.1999

(51)Int.Cl.

G01N 27/327  
G01N 27/28

(21)Application number : 10-163243

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO  
LTD

(22)Date of filing : 11.06.1998

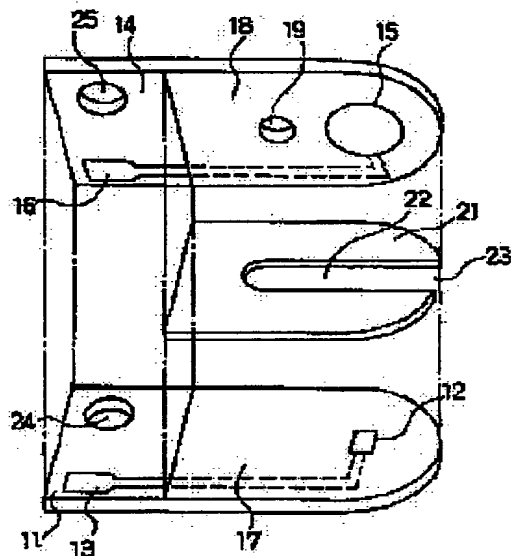
(72)Inventor : IKEDA MAKOTO  
WATANABE KIICHI  
YOSHIOKA TOSHIHIKO  
NANKAI SHIRO

## (54) BIOSENSOR

### (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a biosensor which imparts highly reliable and accurately measured value in a trace of a sample.

SOLUTION: In a biosensor consisting of a working electrode substrate 11, a counter electrode 14 and at least a reagent layer including at least enzyme and electron transmitting material, the working electrode 12 arranged on the working electrode substrate 11 and the counter electrode 15 arranged on the counter substrate 14 are arranged in mutually facing relationship, and the terminals of a measuring terminal can be brought into contact with the terminals 13, 16 of both electrodes from through-holes 25, 24.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-352093

(43) 公開日 平成11年(1999)12月24日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

G 0 1 N 27/327

27/28

識別記号

3 3 1

F I

G 0 1 N 27/30

27/28

3 5 3 R

3 3 1 Z

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願平10-163243

(22) 出願日

平成10年(1998)6月11日

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 池田 信

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 渡邊 基一

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(72) 発明者 吉岡 俊彦

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
産業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 石井 和郎

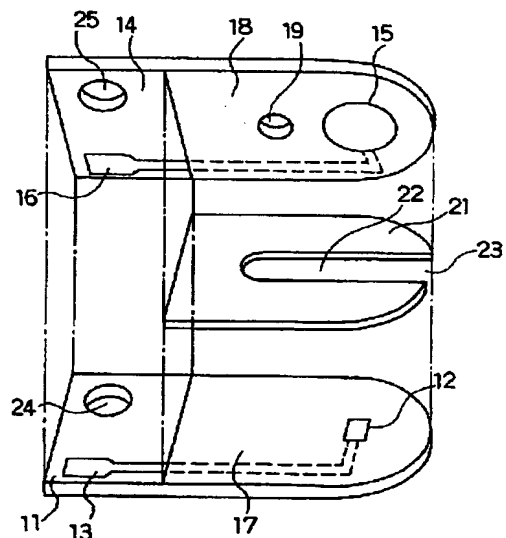
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオセンサ

(57) 【要約】

【課題】 微量の試料で高い信頼性および精度の測定値を与えるバイオセンサを提供する。

【解決手段】 作用極基板11、対極基板14、および少なくとも酵素および電子伝達体を包含する試薬層からなるバイオセンサで、作用極基板上に配置された作用極12と対極基板上に配置された対極15が相互に対向する位置に配置され、測定器の端子は、貫通孔25、24から両電極の端子13、16に接触させることができる。



- |           |            |
|-----------|------------|
| 11 作用極基板  | 17, 18 絶縁層 |
| 12 作用極    | 19 空気孔     |
| 13, 16 端子 | 21 スペーサ    |
| 14 対極基板   | 23 試料供給口   |
| 15 対極     | 24, 25 貫通孔 |

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 作用極基板、対極基板、および少なくとも酵素および電子伝達体を包含する試薬層を具備し、作用極基板上に配置された作用極と対極基板上に配置された対極とが空間部を隔てて相互に対向する位置に配置されていることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項 2】 作用極基板、対極基板、前記両基板間に介在するスペーサ部材、および少なくとも酵素と電子伝達体を包含する試薬層を具備し、作用極基板上に配置された作用極と対極基板上に配置された対極とがスペーサ部材を介して相互に対向する位置に配置されていることを特徴とするバイオセンサ。

【請求項 3】 前記作用極基板および対極基板の少なくとも一方が、他方の基板の電極端子を外部に臨ませる貫通孔を有する請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサ。

【請求項 4】 前記作用極基板および対極基板の一方が、他方の基板の電極端子を外部に臨ませる切欠部を有し、かつ前記一方の基板の電極に接続されたリードが同基板の側面を経由して当該電極が配置された面の背面側に導出されている請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサ。

【請求項 5】 前記作用極基板および対極基板の一方が、他方の基板の電極端子を外部に臨ませる切欠部を有し、かつ前記一方の基板の電極に接続されたリードが同基板の貫通孔に充填された導電性材料を経由して当該電極が配置された面の背面側に導出されている請求項 1 または 2 に記載のバイオセンサ。

【請求項 6】 表面に溝を有する絶縁性基板、前記絶縁性基板に接合されて前記溝部に試料を収容する空間部を形成するカバー部材、前記溝内において相対向して配置された作用極と対極、および前記溝内に配置された少なくとも酵素と電子伝達体を包含する試薬層を具備することを特徴とするバイオセンサ。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、試料中に含まれる基質を迅速かつ高精度に定量するためのバイオセンサに関する。

## 【0002】

【従来の技術】スクロース、グルコースなど糖類の定量分析法として、施光度計法、比色法、還元滴定法および各種クロマトグラフィーを用いた方法等が開発されている。しかし、これらの方法は、いずれも糖類に対する特異性があまり高くないので精度が悪い。これらの方法のうち施光度計法によれば、操作は簡便ではあるが、操作時の温度の影響を大きく受ける。従って、施光度計法は、一般の人々が家庭などで簡易に糖類を定量する方法としては適切でない。ところで、近年、酵素の有する特異的触媒作用を利用した種々のタイプのバイオセンサが開発されている。

【0003】以下に、試料液中の基質の定量法の一例としてグルコースの定量法について説明する。電気化学的なグルコースの定量法としては、グルコースオキシダーゼ（EC 1. 1. 3. 4；以下 GOD と略す）と酸素電極あるいは過酸化水素電極とを使用して行う方法が一般に知られている（例えば、鈴木周一編「バイオセンサー」講談社）。GOD は、酸素を電子伝達体として、基質である  $\beta$ -D-グルコースを D-グルコノ- $\delta$ -ラクトンに選択的に酸化する。酸素の存在下で、GOD による酸化反応過程において、酸素が過酸化水素に還元される。酸素電極によって、この酸素の減少量を計測するか、あるいは過酸化水素電極によって過酸化水素の増加量を計測する。酸素の減少量および過酸化水素の増加量は、試料液中のグルコースの含有量に比例するので、酸素の減少量または過酸化水素の増加量からグルコースの定量が行われる。上記方法では、その反応過程からも推測できるように、測定結果は試料液に含まれる酸素濃度の影響を大きく受ける欠点があり、試料液に酸素が存在しない場合は測定が不可能となる。

【0004】そこで、酸素を電子伝達体として用いず、フェリシアン化カリウム、フェロセン誘導体、キノン誘導体等の有機化合物や金属錯体を電子伝達体として用いる新しいタイプのグルコースセンサが開発されてきた。このタイプのセンサでは、酵素反応の結果生じた電子伝達体の還元体を電極上で酸化することにより、その酸化電流量から試料液に含まれるグルコース濃度が求められる。このような有機化合物や金属錯体を酸素の代わりに電子伝達体として用いることにより、既知量の GOD とそれらの電子伝達体を安定な状態で正確に電極上に担持させて反応層を形成することが可能となる。この場合、反応層を乾燥状態に近い状態で電極系と一体化させることもできるので、この技術に基づいた使い捨て型のグルコースセンサが近年多くの注目を集めている。その代表的な例が、特許第 2 5 1 7 1 5 3 号公報に示されるバイオセンサである。使い捨て型のグルコースセンサにおいては、測定器に着脱可能に接続されたセンサに試料液を導入するだけで容易にグルコース濃度を測定器で測定することができる。このような手法は、グルコースの定量だけに限らず、試料液に含まれる他の基質の定量にも応用可能である。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】上記のようなグルコースセンサを用いた測定では、数  $\mu$  l オーダーの試料量で試料中の基質濃度を容易に求めることができる。しかしながら近年、更に微量、特に  $1 \mu$  l 以下の試料で測定が可能であり、かつ取扱いが簡便で、高性能なバイオセンサの開発が、各方面において切望されている。しかしながら、従来の電気化学グルコースセンサでは、殆どの場合、一平面上に電極系が配置されている。電極系が一平面上にあり、かつ試料が極微量な場合には、電極間の電

荷移動、主にイオンの移動、に対する抵抗が大きくなる。それに伴い、測定結果にばらつきが生ずる場合があった。

#### 【0006】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するために本発明のバイオセンサは、作用極基板、対極基板、および少なくとも酵素と電子伝達体を包含する試薬層を具備し、作用極基板上に配置された作用極と対極基板上に配置された対極とが空間部を隔てて相互に対向する位置に配置されていることを特徴とする。本発明は、作用極基板、対極基板、前記両基板間に介在するスペーサ部材、および少なくとも酵素と電子伝達体を包含する試薬層を具備し、作用極基板上に配置された作用極と対極基板上に配置された対極とがスペーサ部材を介して相互に対向する位置に配置されているバイオセンサを提供する。ここにおいて、前記作用極基板および対極基板の少なくとも一方が、他方の基板の電極端子を外部に臨ませる貫通孔を有することが好ましい。前記作用極基板および対極基板の一方が、他方の基板の電極端子を外部に臨ませる切欠部を有し、かつ前記一方の基板の電極に接続されたリードが同基板の側面を経由して当該電極が配置された面の背面側に導出されていることが好ましい。または、前記作用極基板および対極基板の一方が、他方の基板の電極端子を外部に臨ませる切欠部を有し、かつ前記一方の基板の電極に接続されたリードが同基板の貫通孔に充填された導電性材料を経由して当該電極が配置された面の背面側に導出されていることが好ましい。本発明は、また、表面に溝を有する絶縁性基板、前記絶縁性基板に接合されて前記溝部に試料を収容する空間部を形成するカバー部材、前記溝内において相対向して配置された作用極と対極、および前記溝内に配置された少なくとも酵素と電子伝達体を包含する試薬層を具備するバイオセンサを提供する。

#### 【0007】

【発明の実施の形態】以下、本発明を実施例によりさらに詳しく説明する。

《実施例 1》バイオセンサの一例として、グルコースセンサについて説明する。図 1 は、本実施例のグルコースセンサの外観を示す。作用極基板 1 は、以下のようにして作製した。絶縁性基板上にパラジウムをスパッタリングし、作用極部およびリード／端子部を作製した。次に、基板上に絶縁性部材 7 を貼付することにより、作用極 2、および測定器に挿入する端子部 3 を規定した。一方、外側に膨出した曲面部 6 を有する絶縁性基板の前記曲面部の内壁面に、パラジウムをスパッタリングして対極 5 を形成した。これを対極基板 4 とする。曲面部 6 の端部には、空気孔 8 を有する。GOD と、電子伝達体であるフェリシアン化カリウムとを含有する水溶液を作用極基板 1 の作用極 2 上に滴下し、乾燥して試薬層を作製した。最後に、作用極基板 1 と対極基板 4 を貼り合わせ

て、グルコースセンサを作製した。これにより作用極 2 と対極 5 は、作用極基板 1 と曲面部 6 との間に形成される空間部を介して対向する位置に配置される。この空間部は、試料の収容部となり、空間部の解放端側に試料液を接触させれば毛管現象により試料液は容易に空気孔側へ移動し、電極系に接触する。

【0008】一定量のグルコースを含む溶液を試料としてセンサの空間部に供給し、一定時間経過後に、対極 5 を基準にして作用極 2 に 500 mV の電圧を印加した。対極 5 については、クリップで曲面部 6 の端部を挟むなどにより電氣的導通を得る。この電圧印加により、作用極と対極との間に流れた電流値を測定したところ、液中のグルコース濃度に比例した電流応答が観察された。液中のフェリシアン化イオン、グルコース、GOD が反応し、その結果、グルコースがグルコノラクトンに酸化され、フェリシアン化イオンがフェロシアン化イオンに還元される。このフェロシアン化イオンの濃度は、グルコースの濃度に比例する。よって、その酸化電流に基づいてグルコース濃度を測定することができる。ほぼ等量の試料を、基板の一平面上に電極系を設けたセンサに導入した場合に比較して、本実施例では応答値の増加が観察された。これは、電極系を対向型にしたことにより、電極間のイオン移動が円滑になったためと推察される。

【0009】《実施例 2》図 2 は、本実施例の、試薬層を除いたグルコースセンサの分解斜視図であり、電極／リード配置の一例を示している。作用極基板 11 は、以下の手順にて作製した。まず、ポリエチレンテレフタレートからなる絶縁性基板上に、スクリーン印刷により銀ペーストを印刷し、リード 13 を形成した。ついで、樹脂バインダーを含む導電性カーボンペーストを基板上に印刷して作用極 12 を形成した。この作用極 12 は、リード 13 と接触している。さらに、この基板 11 上に、絶縁性ペーストを印刷して絶縁層 17 を形成した。絶縁層 17 は、作用極 12 の外周部を覆っており、これにより作用極 12 の露出部分の面積を一定に保っている。同様の手順にて、対極基板 14 を作製した。すなわち、絶縁性基板の裏面に銀ペーストを印刷してリード 16 を形成し、次いで導電性カーボンペーストを印刷して対極 15 を形成し、さらに絶縁性ペーストを印刷して絶縁層 18 を形成した。対極基板には、空気孔 19 を形成した。作用極基板 11 と対極基板 14 との間に挟み込むスペーサ 21 は、スリット 22 を有しており、このスリット 22 は作用極基板と対極基板との間に試料供給路を形成するものである。

【0010】実施例 1 と同様にして作用極上に試薬層を作製した後、作用極基板 11、対極基板 14、およびスペーサ 21 を図 2 中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着することにより、バイオセンサを作製した。対極および試薬層を有する作用極は、スペーサ 21 のスリット 22 の部分に形成される試料供給路内へ向き合う

こととなる。対極基板の空気孔 19 は、この試料供給路に連通しているから、スリットの解放端に形成される試料供給口 23 に試料液を接触させれば、毛管現象により試料液は容易に試料供給路内の試薬層に達する。次いで、実施例 1 と同様の手順にてグルコースの測定を行った。両基板間にスペーサを介在させることにより、基板に対して働く物理的圧力に対してセンサの強度が増加する。よって、試料供給路の容積が一定に保たれやすく、センサ応答に与える物理的圧力等の影響が軽減される。測定の結果、液中のグルコース濃度に比例した電流応答が観察され、応答のばらつきが低減した。

【0011】《実施例 3》図 3 は、本実施例の、試薬層を除いたグルコースセンサの分解斜視図である。作用極基板 11 および対極基板 14 にそれぞれ端子を外部に臨ませるための貫通孔 24 および 25 を設けた以外は、実施例 2 と同じ構成である。貫通孔を両基板に設けることにより、作用極基板 11 の貫通孔 24 からは対極基板 14 のリード／端子 16 の一部が露出する。一方、対極基板 14 の貫通孔 25 からは作用極基板 11 のリード／端子 13 の一部が露出する。スペーサ 21 が端子部まで延在している場合には、対応する貫通孔をスペーサにも設ければよい。これにより、貼り合わせ型センサチップの測定器への装着、すなわちセンサチップと測定器との電気的接続がより確実なものになり、測定精度が向上する。

【0012】《実施例 4》図 4 は、本実施例の、試薬層を除いたグルコースセンサの分解斜視図である。作用極基板 11 およびスペーサ 21 は、実施例 2 と同じ構成である。一方、対極基板 34 は、作用極基板 11 の端子部 13 に対応する部分を切り欠いた切欠部 36 を有する絶縁性基板に、側面も含めた全面にパラジウムをスパッタリングして作製した。従って、対極基板 34 の下面に形成されたパラジウム層 35 が対極として働き、この対極は基板の側面から上面に形成されたパラジウム層の端子部に導通している。実施例 1 と同様に作用極基板の作用極上に試薬層を作製した後、作用極基板 11、空気孔 39 を備えた対極基板 34、およびスペーサ 21 を図 4 中の一点鎖線で示すような位置関係をもって接着し、バイオセンサを作製した。切欠部 36 を対極基板 34 に設けることにより、切欠部 36 からは作用極基板 11 のリード／端子の一部が露出する。スペーサ 21 が端子部まで延在している場合には、対応する切欠部をスペーサ 21 にも設ければよい。一方、対極 35 に電気的に接続されているリードは、対極基板 34 の側面を経由して、上面に導出される。これにより、片面のみに両端子部が露出されていることとなる。従って、このような構造のセンサに対しては、従来一般的に用いられてきた測定器側の接続端子を、そのまま適用することができるから、製造コストの低減に効果がある。シート状の基板の側面部に配置されたリード部は、上面部、下面部に比べて物理的

強度に問題がある場合がある。そのような場合は、図 5 に示すように、対極基板 34 に貫通孔 37 を設け、そこに、例えば銀ペーストやカーボンペーストのような導電性材料を充填してもよい。その場合には、基板の下面に配置された電極のリードは、この導電性材料を経由して基板上面の端子部に接続される。

【0013】本実施例においては、対極基板 34 に切欠部 36、あるいはさらに貫通孔 37 を設けた例について述べたが、これら切欠部や貫通孔を、作用極基板 11 に設けた場合においても同様の効果が得られる。しかしながらその場合は、絶縁層等を用いて作用極面積を規定する必要がある。

【0014】《実施例 5》図 6 は、本実施例の試薬層を除いたグルコースセンサの分解斜視図である。絶縁性基板 40 は、先端面および上面を解放した溝 41 を有し、溝 41 の互いに対向する側壁から上面にまたがってパラジウムをスパッタリングし、次にレーザでトリミングすることにより、作用極 42、対極 45、および各電極に対応したリード部／端子部 43、46 を形成した。また、前記のリード部を部分的に覆うように絶縁層 47 を形成した。次に、GOD とフェリシアン化カリウムを含む水溶液を溝 41 に滴下し、乾燥して試薬層を形成した。そして、溝 41 の奥側と対応する位置に空気孔 49 を有するカバー 48 を、図 6 中の一点鎖線で示すような位置関係をもって基板 40 に接着し、バイオセンサを作製した。このバイオセンサにおいては、基板の溝 41 の部分が試料収容部であり、基板の端面の溝 41 の解放部に試料液を接触させれば、毛管現象により試料液は容易に空気孔側へ移動し、両電極に接触する。前記実施例のように、電極を有する基板同志を貼り合わせて組み立てられるセンサでは、その貼り合わせ工程において電極間の位置ずれが生ずる場合がある。本実施例のセンサでは、溝 41 の内壁面に電極系を形成するために、貼り付け工程に伴う電極間の位置ずれがなく、従って電極間の位置ずれに起因する測定精度の低下は生じない。

【0015】以上の実施例では、電極系への印加電圧を 500 mV としたが、これに限定されることはない。酵素反応に伴い還元された電子伝達体が酸化される電圧であればよい。反応層に含有される酸化還元酵素としては、試料液に含まれる測定対象の基質に対応したものが用いられる。酸化還元酵素としては、例えば、フルクトースデヒドロゲナーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、アミノ酸オキシダーゼなどがあげられる。電子伝達体としては、フェリシアン化カリウム、p-ベンゾキノン、フェナジメトサルフェート、メチレンブルー、フェロセン誘導体などがあげられる。また、酸素を電子伝達体とした場合にも電流応答が得られる。電子伝達体は、これらの一種または二種以上が使用される。試薬層は、これを作用極

に固定化することによって、酵素あるいは電子伝達体を不溶化させてもよい。固定化する場合は、架橋固定法あるいは吸着法が好ましい。また、電極材料中に混合させてもよい。

【0016】上記実施例では、特定の電極系、リード／端子、および測定器側の接続端子を前記の端子に接触させるために基板に設ける貫通孔や切欠部を示したが、それらの形状、配置等は実施例のものに限定されるものではない。また、上記実施例では、電極材料としてカーボンあるいはパラジウムについて述べたが、これに限定されることはない。作用極材料としては、電子伝達体を酸化する際にそれ自身が酸化されない導電性材料であれば使用できる。また、対極材料としては、銀、白金等の一般的に用いられる導電性材料であれば使用できる。

【0017】

【発明の効果】以上のように本発明によれば、微量の試料で高い信頼性および精度の測定値を与えるバイオセンサが得られる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の一実施例におけるグルコースセンサを示す斜視図である。

【図2】本発明の他の実施例におけるグルコースセンサの分解斜視図である。

【図3】本発明のさらに他の実施例のグルコースセンサの分解斜視図である。

【図4】本発明の他の実施例のグルコースセンサの分解

斜視図である。

【図5】本発明のさらに他の実施例のグルコースセンサの分解斜視図である。

【図6】本発明の他の実施例のグルコースセンサの分解斜視図である。

【符号の説明】

1 作用極基板

2 作用極

3 作用極端子

10 4 対極基板

5 対極

6 曲面部

7 絶縁層

8 空気孔

11 作用極基板

12 作用極

13、16 端子

14、34 対極基板

15、35 対極

17、18 絶縁層

19、39 空気孔

21 スペーサ

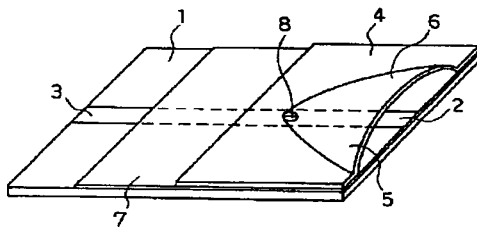
22 スリット

23 試料供給口

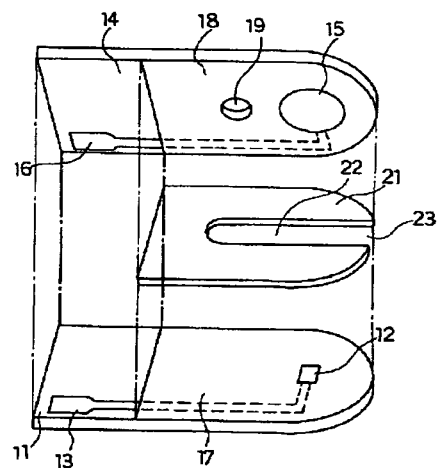
24、25、37 貫通孔

36 切欠部

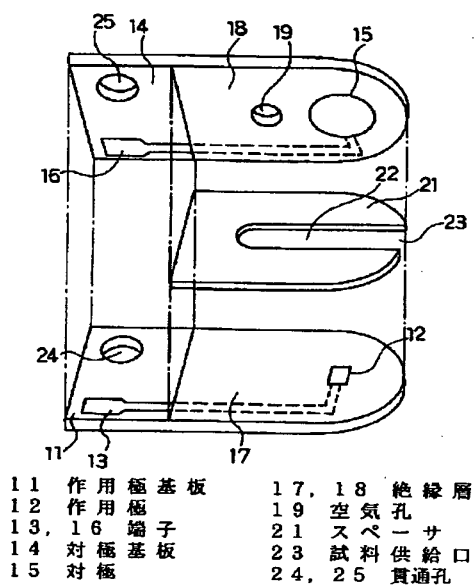
【図1】



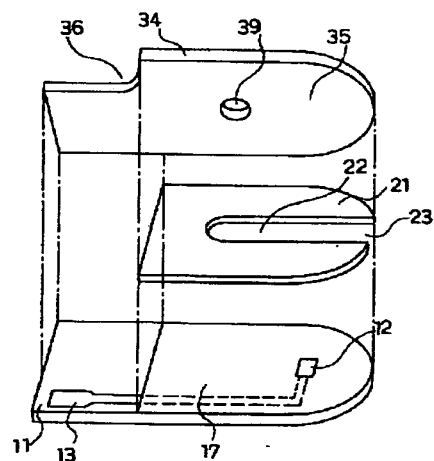
【図2】



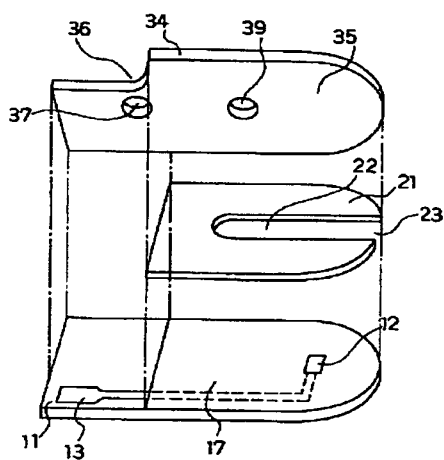
【図3】



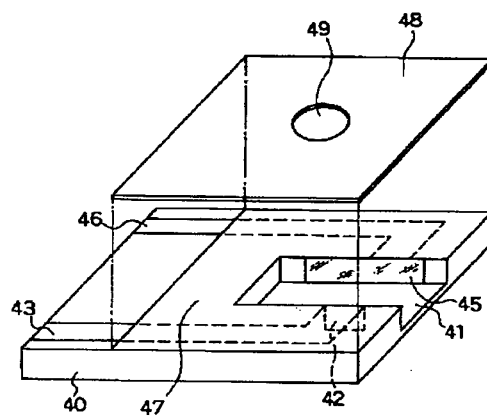
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72) 発明者 南海 史朗  
 大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器  
 産業株式会社内